

09/60093

PCT/JP 98 03328

10.08.98

6

日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 25 SEP 1998

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

U

出願年月日  
Date of Application:

1998年 1月23日

出願番号  
Application Number:

平成10年特許願第011281号

出願人  
Applicant(s):

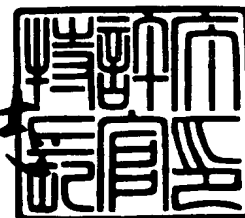
扶桑薬品工業株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1998年 9月11日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

伴佐山建志



出証番号 出証特平10-3071863

【書類名】 特許願

【整理番号】 980123P-01

【特記事項】 特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特  
許出願

【提出日】 平成10年 1月23日

【あて先】 特許庁長官 荒井 寿光 殿

【国際特許分類】 C12N 15/12  
C07K 14/47  
C07K 14/435

【発明の名称】 新規コレクチン

【請求項の数】 11

【発明者】

    【住所又は居所】 大阪府茨木市大池1丁目9-20

    【氏名】 若宮 伸隆

【特許出願人】

    【識別番号】 000238201

    【氏名又は名称】 扶桑薬品工業株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100065868

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 角田 嘉宏

    【電話番号】 078-321-8822

【選任した代理人】

    【識別番号】 100088960

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 高石 ▲さとり▼

    【電話番号】 078-321-8822

【選任した代理人】

    【識別番号】 100106242

【弁理士】

【氏名又は名称】 古川 安航

【電話番号】 078-321-8822

【選任した代理人】

【識別番号】 100107940

【弁理士】

【氏名又は名称】 岡 憲吾

【電話番号】 078-321-8822

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 006220

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9705390

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規コレクチン

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下のアミノ酸配列すなわち、

Met-Asn-Gly-Phe-Ala-Ser-Leu-Leu-Arg-Arg-Asn-Gln-Phe-Ile-Leu-Leu-Val-Leu-Phe-Leu-Leu-Gln-Ile-Gln-Ser-Leu-Gly-Leu-Asp-Ile-Asp-Ser-Arg-Pro-Thr-Ala-Glu-Val-Cys-Ala-Thr-His-Thr-Ile-Ser-Pro-Gly-Pro-Lys-Gly-Asp-Asp-Gly-Glu-Lys-Gly-Asp-Pro-Gly-Glu-Glu-Gly-Lys-His-Gly-Lys-Val-Gly-Arg-Met-Gly-Pro-Lys-Gly-Ile-Lys-Gly-Glu-Leu-Gly-Asp-Met-Gly-Asp-Arg-Gly-Asn-Ile-Gly-Lys-Thr-Gly-Pro-Ile-Gly-Lys-Lys-Gly-Asp-Lys-Gly-Glu-Lys-Gly-Leu-Leu-Gly-Ile-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Lys-Ala-Gly-Thr-Val-Cys-Asp-Cys-Gly-Arg-Tyr-Arg-Lys-Phe-Val-Gly-Gln-Leu-Asp-Ile-Ser-Ile-Ala-Arg-Leu-Lys-Thr-Ser-Met-Lys-Phe-Val-Lys-Asn-Val-Ile-Ala-Gly-Ile-Arg-Glu-Thr-Glu-Glu-Lys-Phe-Tyr-Tyr-Ile-Val-Gln-Glu-Glu-Lys-Asn-Tyr-Arg-Glu-Ser-Leu-Thr-His-Cys-Arg-Ile-Arg-Gly-Gly-Met-Leu-Ala-Met-Pro-Lys-Asp-Glu-Ala-Ala-Asn-Thr-Leu-Ile-Ala-Asp-Tyr-Val-Ala-Lys-Ser-Gly-Phe-Phe-Arg-Val-Phe-Ile-Gly-Val-Asn-Asp-Leu-Glu-Arg-Glu-Gly-Gln-Tyr-Met-Phe-Thr-Asp-Asn-Thr-Pro-Leu-Gln-Asn-Tyr-Ser-Asn-Trp-Asn-Glu-Gly-Glu-Pro-Ser-Asp-Pro-Tyr-Gly-His-Glu-Asp-Cys-Val-Glu-Met-Leu-Ser-Ser-Gly-Arg-Trp-Asn-Asp-Thr-Glu-Cys-His-Leu-Thr-Met-Tyr-Phe-Val-Cys-Glu-Phe-Ile-Lys-Lys-Lys-Lys (配列番号：2)

からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

【請求項 2】 以下の塩基配列すなわち、

CAGCAATGAA TGGCTTTGCA TCCTTGCTTC GAAGAAACCA ATTTATCCTC CTGGTACTAT  
TTCTTTTGCA AATTCAGAGT CTGGGTCTGG ATATTGATAG CCGTCCTACC GCTGAAGTCT  
GTGCCACACA CACAATTTCA CCAGGACCCA AAGGAGATGA TGGTGAAAAA GGAGATCCAG  
GAGAAGAGGG AAAGCATGGC AAAGTGGGAC GCATGGGGCC GAAAGGAATT AAAGGAGAAC  
TGGGTGATAT GGGAGATCGG GGCAATATTG GCAAGACTGG GCCCATTGGG AAGAAGGGTG

ACAAAGGGGA AAAAGGTTTG CTTGGAATAC CTGGAGAAAA AGGCAAAGCA GGTACTGTCT  
 GTGATTGTGG AAGATACCGG AAATTTGTTG GACAACTGGA TATTAGTATT GCCCGGCTCA  
 AGACATCTAT GAAGTTTGTC AAGAATGTGA TAGCAGGGAT TAGGGAAACT GAAGAGAAAT  
 TCTACTACAT CGTGCAGGAA GAGAAGAACT ACAGGGAATC CCTAACCAC TGCAGGATTC  
 GGGGTGGAAT GCTAGCCATG CCCAAGGATG AAGCTGCCAA CACACTCATC GCTGACTATG  
 TTGCCAAGAG TGGCTTCTTT CGGGTGTTCA TTGGCGTGAA TGACCTTGAA AGGGAGGGAC  
 AGTACATGTT CACAGACAAC ACTCCACTGC AGAACTATAG CAACTGGAAT GAGGGGGAAC  
 CCAGCGACCC CTATGGTCAT GAGGACTGTG TGGAGATGCT GAGCTCTGGC AGATGGAATG  
 ACACAGAGTG CCATCTTACC ATGTACTTTG TCTGTGAGTT CATCAAGAAG AAAAAGTAAC  
 TTCCCTCATC CTACGTATTT GCTATTTTCC TGTGACCGTC ATTACAGTTA TTGTTATCCA  
 TCCTTTTTTT CCTGATTGTA CTACATTTGA TCTGAGTCAA CATAGCTAGA AAATGCTAAA  
 CTGAGGTATG GAGCCTCCAT CATCATGCTC TTTTGTGATG ATTTTCATAT TTTCACACAT  
 GGTATGTTAT TGACCCAATA ACTCGCCAGG TTACATGGGT CTTGAGAGAG AATTTTAATT  
 ACTAATTGTG CACGAGATAG TTGGTTGTCT ATATGTCAAA TGAGTTGTTC TCTTGGTATT  
 TGCTCTACCA TCTCTCCCTA GAGCACTCTG TGTCTATCCC AGTGGATAAT TTCCCAGTTT  
 ACTGGTGATG ATTAGGAAGG TTGTTGATGG TTAGGCTAAC CTGCCCTGGC CCAAAGCCAG  
 ACATGTACAA GGGCTTTCTG TGAGCAATGA TAAGATCTTT GAATCCAAGA TGCCCAGATG  
 TTTTACCAGT CACACCCTAT GGCCATGGCT ATACTTGGA GTTCTCCTTG TTGGCACAGA  
 CATAGAAATG CTTTAACCCC AAGCCTTTAT ATGGGGGACT TCTAGCTTTG TGTCTTGTTT  
 CAGACCATGT GGAATGATAA ATACTCTTTT TGTGCTTCTG ATCTATCGAT TTCACTAACA  
 TATACCAAGT AGGTGCTTTG AACCCTTTT TGTAGGCTCA CACCTTAATC TCAGGCCCTT  
 ATATAGTCAC ACTTTGATTT AAGAAAAACG GAGCC (配列番号 : 1)

で示される塩基配列を含むポリヌクレオチド。

【請求項3】 以下のアミノ酸配列すなわち、

Glu-Lys-Cys-Val-Glu-Met-Tyr-Thr-Asp-Gly-Lys-Trp-Asn-Asp-Arg-Asn-  
 Cys-Leu-Gln-Ser-Arg-Leu-Ala-Ile-Cys-Glu-Phe (配列番号 : 3)

で示される、コレクチンタンパク質のコンセンサス配列と高い相同性を有する遺  
 伝子クローンに基づいて作製されたプローブと、ストリンジェントな条件下でハ  
 イブリダイズすることができ、且つコレクチンタンパク質をコードするポリヌク

レオチド。

【請求項4】 前記プローブが、以下の塩基配列すなわち、  
TTTGTGAGGCTCCATACC（配列番号：7）及び  
CTGCCAACACACTCATCGCTG（配列番号：8）

で示される塩基配列を有するプライマーを用いて行ったPCR反応の増幅産物である請求項3記載のポリヌクレオチド。

【請求項5】 請求項1乃至4のいずれかに記載のポリヌクレオチドとストリンジントな条件下でハイブリダイズでき、該ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質が、（1）Ca<sup>2+</sup>要求性の糖認識領域（CRD）、（2）ネック領域、（3）コラーゲン様領域、及び（4）システインを含むN末端領域を含む、ヒトコレクチンタンパク質であるポリヌクレオチド。

【請求項6】 前記ポリヌクレオチドが、cDNAである請求項1乃至5のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

【請求項7】 請求項3乃至6のいずれかに記載のポリヌクレオチドによってコードされるコレクチンタンパク質。

【請求項8】 以下のアミノ酸配列すなわち、  
Met-Asn-Gly-Phe-Ala-Ser-Leu-Leu-Arg-Arg-Asn-Gln-Phe-Ile-Leu-Leu-  
Val-Leu-Phe-Leu-Leu-Gln-Ile-Gln-Ser-Leu-Gly-Leu-Asp-Ile-Asp-Ser-  
Arg-Pro-Thr-Ala-Glu-Val-Cys-Ala-Thr-His-Thr-Ile-Ser-Pro-Gly-Pro-  
Lys-Gly-Asp-Asp-Gly-Glu-Lys-Gly-Asp-Pro-Gly-Glu-Glu-Gly-Lys-His-  
Gly-Lys-Val-Gly-Arg-Met-Gly-Pro-Lys-Gly-Ile-Lys-Gly-Glu-Leu-Gly-  
Asp-Met-Gly-Asp-Arg-Gly-Asn-Ile-Gly-Lys-Thr-Gly-Pro-Ile-Gly-Lys-  
Lys-Gly-Asp-Lys-Gly-Glu-Lys-Gly-Leu-Leu-Gly-Ile-Pro-Gly-Glu-Lys-  
Gly-Lys-Ala-Gly-Thr-Val-Cys-Asp-Cys-Gly-Arg-Tyr-Arg-Lys-Phe-Val-  
Gly-Gln-Leu-Asp-Ile-Ser-Ile-Ala-Arg-Leu-Lys-Thr-Ser-Met-Lys-Phe-  
Val-Lys-Asn-Val-Ile-Ala-Gly-Ile-Arg-Glu-Thr-Glu-Glu-Lys-Phe-Tyr-  
Tyr-Ile-Val-Gln-Glu-Glu-Lys-Asn-Tyr-Arg-Glu-Ser-Leu-Thr-His-Cys-  
Arg-Ile-Arg-Gly-Gly-Met-Leu-Ala-Met-Pro-Lys-Asp-Glu-Ala-Ala-Asn-  
Thr-Leu-Ile-Ala-Asp-Tyr-Val-Ala-Lys-Ser-Gly-Phe-Phe-Arg-Val-Phe-

Ile-Gly-Val-Asn-Asp-Leu-Glu-Arg-Glu-Gly-Gln-Tyr-Met-Phe-Thr-Asp-  
Asn-Thr-Pro-Leu-Gln-Asn-Tyr-Ser-Asn-Trp-Asn-Glu-Gly-Glu-Pro-Ser-  
Asp-Pro-Tyr-Gly-His-Glu-Asp-Cys-Val-Glu-Met-Leu-Ser-Ser-Gly-Arg-  
Trp-Asn-Asp-Thr-Glu-Cys-His-Leu-Thr-Met-Tyr-Phe-Val-Cys-Glu-Phe-  
Ile-Lys-Lys-Lys-Lys (配列番号: 2)

で示されるアミノ酸配列を含むコレクチンタンパク質。

【請求項9】 以下の塩基配列すなわち、

CAGCAATGAA TGGCTTTGCA TCCTTGCTTC GAAGAAACCA ATTTATCCTC CTGGTACTAT  
TTCTTTTGCA AATTCAGAGT CTGGGTCTGG ATATTGATAG CCGTCCTACC GCTGAAGTCT  
GTGCCACACA CACAATTTCA CCAGGACCCA AAGGAGATGA TGGTGAAAAA GGAGATCCAG  
GAGAAGAGGG AAAGCATGGC AAAGTGGGAC GCATGGGGCC GAAAGGAATT AAAGGAGAAC  
TGGGTGATAT GGGAGATCGG GGCAATATTG GCAAGACTGG GCCCATTGGG AAGAAGGGTG  
ACAAAGGGGA AAAAGGTTTG CTTGGAATAC CTGGAGAAAA AGGCAAAGCA GGTACTGTCT  
GTGATTGTGG AAGATACCGG AAATTTGTTG GACAACTGGA TATTAGTATT GCCCGGCTCA  
AGACATCTAT GAAGTTTGTC AAGAATGTGA TAGCAGGGAT TAGGGAAACT GAAGAGAAAT  
TCTACTACAT CGTGCAGGAA GAGAAGAACT ACAGGGAATC CCTAACCCAC TGCAGGATTC  
GGGGTGGAAAT GCTAGCCATG CCCAAGGATG AAGCTGCCAA CACACTCATC GCTGACTATG  
TTGCCAAGAG TGGCTTCTTT CGGGTGTTCA TTGGCGTGAA TGACCTTGAA AGGGAGGGAC  
AGTACATGTT CACAGACAAC ACTCCACTGC AGAACTATAG CAACTGGAAT GAGGGGGAAC  
CCAGCGACCC CTATGGTCAT GAGGACTGTG TGGAGATGCT GAGCTCTGGC AGATGGAATG  
ACACAGAGTG CCATCTTACC ATGTACTTTG TCTGTGAGTT CATCAAGAAG AAAAAGTAAC  
TTCCCTCATC CTACGTATTT GCTATTTTCC TGTGACCGTC ATTACAGTTA TTGTTATCCA  
TCCTTTTTTT CCTGATTGTA CTACATTTGA TCTGAGTCAA CATAGCTAGA AAATGCTAAA  
CTGAGGTATG GAGCCTCCAT CATCATGCTC TTTTGTGATG ATTTTCATAT TTTCACACAT  
GGTATGTTAT TGACCCAATA ACTCGCCAGG TTACATGGGT CTTGAGAGAG AATTTTAATT  
ACTAATTGTG CACGAGATAG TTGGTTGTCT ATATGTCAA TGAGTTGTTC TCTTGGTATT  
TGCTCTACCA TCTCTCCCTA GAGCACTCTG TGTCTATCCC AGTGGATAAT TTCCCAGTTT  
ACTGGTGATG ATTAGGAAGG TTGTTGATGG TTAGGCTAAC CTGCCCTGGC CCAAAGCCAG  
ACATGTACAA GGGCTTTCTG TGAGCAATGA TAAGATCTTT GAATCCAAGA TGCCCAGATG

TTTACCAGT CACACCCTAT GGCCATGGCT ATACTTGGAA GTTCTCCTTG TTGGCACAGA  
CATAGAAATG CTTTAACCCC AAGCCTTTAT ATGGGGGACT TCTAGCTTTG TGTCTTGTTT  
CAGACCATGT GGAATGATAA ATACTCTTTT TGTGCTTCTG ATCTATCGAT TTCACTAACA  
TATACCAAGT AGGTGCTTTG AACCCCTTTC TGTAGGCTCA CACCTTAATC TCAGGCCCTT  
ATATAGTCAC ACTTTGATTT AAGAAAAACG GAGCC (配列番号 : 1)

で示される塩基配列を有するポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を含むコレクチンタンパク質。

【請求項 10】 前記コレクチンタンパク質が、ヒト由来のコレクチンタンパク質である請求項 7 乃至 9 のいずれかに記載のコレクチンタンパク質。

【請求項 11】 請求項 7 乃至 10 のいずれかに記載のコレクチンタンパク質のアミノ酸配列において、1 または複数のアミノ酸が欠失、置換及び／または付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、(1)  $Ca^{2+}$  要求性の糖認識領域 (CRD)、(2) ネック領域、(3) コラーゲン様領域、及び (4) システインを含む N 末端領域、を含むことを特徴とするコレクチンタンパク質。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

#### 【発明の属する技術分野】

本発明は、生体防御機構の解明に有用であり、また抗ウイルス活性などを含む生理活性を有することが期待され、医薬品用途への応用が可能であると考えられる。新規コレクチンに関する。

##### 【0002】

#### 【従来の技術】

コレクチンは、 $Ca^{2+}$  要求性の糖認識領域 (CRD) 及びコラーゲン様領域を有するタンパク質の総称であり、細菌、ウイルスを始め様々な微生物に対する基礎免疫に関与していると考えられている。

##### 【0003】

これまでに見出されているコレクチンとして、マンナン結合タンパク質 (MBP)、サーファクタントタンパク質 A (SP-A) およびサーファクタントタンパク質 D (SP-D)、コングルチニンなどを挙げるができる。これらのコレクチン



は、図1(a)に示すような、(1)  $\text{Ca}^{2+}$  要求性の糖認識領域(CRD)、(2) ネック領域、(3) コラーゲン様領域、及び(4) システインを含むN末端領域の4種の特徴的な領域を含む基本構造から構成されていることが知られており [Malhortraら、ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・イムノロジー (Eur.J.Immunol.)、22巻、1437~1445頁、1992年]、この基本構造3個がコラーゲン様領域においてトリプルヘリックスを構成することによりサブユニットを形成し、さらにこのサブユニットが3量体、4量体、6量体等のオリゴマー構造を形成している。

【0004】

脊椎動物では、細胞を介する免疫応答および特異的抗体反応によるメカニズムが、病原菌、ウイルスなどの侵入に対する最大の生体防御システムと考えられている。最近になって、コングルチニン等のレクチンによる非特異的な免疫応答への関与が示唆され、例えば、母親の移行抗体や特異的防御システムが十分に発達していない小児に対し、種々の微生物の中和作用や排除に重要な役割を果たしているとの報告がなされている [Superら、ランセット (Lancet)、2巻、1236~1239頁、1989年]。さらに、宿主の生体防御におけるこれらレクチンの役割について、例えば、MBPの遺伝子上の変異に起因したMBPの血中濃度の低下によって、宿主が感染を受けやすくなるという研究結果が報告されている [Sumiyaら、ランセット、337巻、1569~1570頁、1991年]。

【0005】

本発明者らのグループは、以前に、コングルチニンおよびマンナン結合タンパク質が、H1およびH3タイプのインフルエンザAウイルスの感染や赤血球凝集活性を阻害することを見出した [Wakamiyaら、グライココンジュゲイト・ジャーナル (Glycoconjugate J.)、8巻、235頁、1991年；Wakamiyaら、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochem. Biophys. Res. Comm.)、187巻、1270~1278頁、1992年]。

【0006】

その後さらに、コングルチニンをコードするcDNAクローンを取得し、コングルチニンと種々のサーファクタントタンパク質D遺伝子との間の強い関連性も見出

されている〔Suzukiら、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ、191巻、335～342頁、1993年〕。

【0007】

このように、コレクチンは、生体防御機構の解明における有用性及び生理活性医薬物質としての有用性などが期待される物質であるが、このファミリーに属するさらなる他分子種の存在についての報告はなされていないという現状にある。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、かかる現状に鑑みてなされたものであり、特にヒトの体内で抗細菌、ウイルス活性などの生理活性を発揮することが期待される新規コレクチンを得ることを目的とするものである。

【0009】

【課題を解決するための手段】

すなわち、本発明は、

- ① 配列番号：2で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、
- ② 配列番号：1で示される塩基配列を含むポリヌクレオチド、
- ③ Glu-Lys-Cys-Val-Glu-Met-Tyr-Thr-Asp-Gly-Lys-Trp-Asn-Asp-Arg-Asn-Cys-Leu-Gln-Ser-Arg-Leu-Ala-Ile-Cys-Glu-Phe（配列番号：3）で示される、コレクチンタンパク質のコンセンサス配列と高い相同性を有する遺伝子クローンに基づいて作製されたプローブと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができ、且つコレクチンタンパク質をコードするポリヌクレオチド、
- ④ ①～③に記載のポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズでき、該ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質が、（1）Ca<sup>2+</sup>要求性の糖認識領域（CRD）、（2）ネック領域、（3）コラーゲン様領域、及び（4）システインを含むN末端領域を含む、ヒトコレクチンタンパク質であるポリヌクレオチド、
- ⑤ ③または④に記載のポリヌクレオチドによってコードされるコレクチンタンパク質、

- ⑥ 配列番号：2で示されるアミノ酸配列を含むコレクチンタンパク質、
- ⑦ 配列番号：1で示される塩基配列を有するポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を含むコレクチンタンパク質、ならびに
- ⑧ ⑤乃至⑦のいずれかに記載のコレクチンタンパク質のアミノ酸配列において、1または複数のアミノ酸が欠失、置換及び／または付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、(1)  $\text{Ca}^{2+}$  要求性の糖認識領域 (CRD)、(2) ネック領域、(3) コラーゲン様領域、及び(4) システインを含むN末端領域を含む、コレクチンタンパク質をその要旨とし、
- コレクチンに特徴的な構造を有し、従来報告されているものとは異なる新規のコレクチン遺伝子及びタンパク質を提供するものである。

【0010】

【発明の実施の形態】

上記のごとき、本発明によって提供される新規コレクチン遺伝子及びタンパク質において、特に、前記③におけるプローブが、以下の塩基配列すなわち、TTTGTGATGGAGGCTCCATACC (配列番号：7) 及びCTGCCAACACACTCATCGCTG (配列番号：8) で示される塩基配列を有するプライマーを用いて行ったPCR反応の増幅産物であることが、目的のコレクチンタンパク質をコードするポリヌクレオチドを取得するためには好ましい。

【0011】

また、前記ポリヌクレオチドは、好ましくはcDNAである。

【0012】

さらに、本発明のタンパク質は、ヒト由来であることが、ヒトの体内で抗細菌、ウイルス活性などを発揮できることが期待され、生理活性医薬物質としての有用性に鑑みて好ましい。従って、本発明のタンパク質は、ヒト由来のコレクチンタンパク質を企図するものであり、様々なヒト生体組織を検討したところ、有用と考えられるコレクチンタンパク質がヒト肝臓に発現されていることが示された。

【0013】

上記③及び④におけるストリンジントなハイブリダイゼーション条件として

は、例えば、5 x SSC (20 x SSC (3 M NaCl、0.3 Mクエン酸ナトリウム) を4倍希釈することにより5 x SSCを調製)、1%ブロッキング剤 (ペーリンガー・マンハイム社製)、0.1% N-ラウロイルサルコシン、0.02% SDSの溶液中で、68℃にて1時間プレハイブリダイゼーション；cDNAプローブ (10 ng/ml) を含む5 x SSC、1%ブロッキング剤、0.1% N-ラウロイルサルコシン、0.02% SDSの溶液中で、55℃にて16時間ハイブリダイゼーション：2 x SSC/0.1%SDS溶液で5分間2回洗浄；55℃にて、0.5 x SSC/0.1%SDS溶液で15分間2回洗浄を行う一連の処理工程を含むハイブリダイゼーションが含まれるが、当該技術分野における知識に基づき、溶液濃度や温度、時間等の条件を適宜に変更することができる。

## 【0014】

また、上記⑧において、(4) システインを含むN末端領域には、システインが少なくとも1つ、好ましくは1つ含まれる。

## 【0015】

そして、上記⑧における、1または複数のアミノ酸の欠失、置換及び／または付加とは、コレクチンタンパク質の親水性・疎水性、酸性・塩基性、含有基などに大幅な変化をきたさず、上記4種の領域、(特に(1)  $\text{Ca}^{2+}$  要求性の糖認識領域 (CRD) 及び(3) コラーゲン様領域) の有する各々の特徴を変えることが少ない範囲でのアミノ酸の欠失、置換及び／または付加を称する。これまでに報告されているコレクチンファミリーのタンパク質のアミノ酸配列とその構造に基づき、例えば(1)  $\text{Ca}^{2+}$  要求性の糖認識領域 (CRD) 及び(2) ネック領域において1～10程度、(3) コラーゲン様領域において1～100程度、好ましくは1～15、ならびに(4) システインを含むN末端領域とシグナル配列において1～20程度のアミノ酸の欠失、置換及び／または付加が許容され则认为られる。

## 【0016】

以下に、本発明の新規コレクチンに関して、実施例に沿って詳細に説明するが、これら実施例の開示によって、本発明が限定的に解釈されるべきでないことは勿論である。

## 【0017】

すなわち、ESTデータベースの検索 (実施例1)、スクリーニング用プローブ

の作製（実施例2）、ヒト肝臓由来cDNAライブラリーのスクリーニング（実施例3）、新規コレクチンの塩基配列の決定（実施例4）、新規コレクチンのゲノミックサザン分析（実施例5）、新規コレクチンのヒトの種々の組織に対するノーザン分析（実施例6）、新規コレクチンの種々の動物種の組織についてのゲノミックサザン分析（実施例7）ならびに新規コレクチンの遺伝学的解析（実施例8）について以下に説明する。

## 【0018】

実施例1：ESTデータベースの検索

既知のコレクチンすなわち、MBP、SP-A及びSP-Dのアミノ酸配列（図2及び3参照、図中、相同と認められるアミノ酸残基部分に囲みを付した）を比較することにより、分子間に保存性の高い領域の検索を行った。この結果、ヒトMBPのアミノ酸配列における第220番目から246番目までの27アミノ酸（図3、白抜文字部分）に保存性が高いことが明かとなったので、この領域に相当するコンセンサス配列をいくつか作成し、EST（Expressed Sequence Tags）データベースの検索を行った。ESTデータベースは、1996年10月11日に、676750件の配列を含むものを使用した。

## 【0019】

その結果、相同性の高いアミノ酸配列を含むデータがいくつか得られた。得られたデータのアミノ酸配列についてGenBank/ESTデータベースの検索を行い、既知または未知物質のいずれであるかを判定した結果、コンセンサス配列として、Glu-Lys-Cys-Val-Glu-Met-Tyr-Thr-Asp-Gly-Lys-Trp-Asn-Asp-Arg-Asn-Cys-Leu-Gln-Ser-Arg-Leu-Ala-Ile-Cys-Glu-Phe（配列番号：3）で示されるアミノ酸配列を用いたときに得られたデータの中に、相同性は高いが未知の塩基配列を含むデータ（登録番号：R29493）を得ることができた。これは、22週令のヒト胎児肝臓cDNAライブラリー由来のクローン（F1-1006D）で、5'末端側の326塩基の配列を示すデータであった。

## 【0020】

そこで、このデータのもとになるクローンを保有しているPohang Institute of Science & Technology（韓国、Pohang）のHee-Sup Shin氏に当該クローンを分

ブラリー0.1 mlを37℃15分インキュベートし、その後2.5 mlのLB-TOP アガー (0.75%アガー/LB培地) に加え均一とし、90mmφ LB培地プレート (岩城硝子社製) (1.5%アガー/LB培地) にまいた。15分間室温で固化させ、42℃にて5時間インキュベーションした。各プレートのプラークを計数後、ファージのタイターを計算により求めた。その結果、タイターは $2.3 \times 10^{10}$  pfu/mlであった。このようにタイトレーションを行ったcDNAライブラリーにつき、実施例2で作製したプローブを用いて以下の通りにスクリーニングを行った。

## 【0024】

mLB培地で37℃にて16時間培養した *Escherichia coli* Y1090r<sup>-</sup> 0.6mlとSM 緩衝液で希釈したcDNAライブラリー $1 \times 10^5$  pfuを、37℃にて15分間インキュベートし、その後7.5 ml LB-TOP アガロース (0.75%アガロース) に加えて均一とした。これを140 mm<sup>2</sup>のLB培地角プレート (日水製薬社製) にまいたものを10枚作製し、15分間室温で固化させ、42℃にて5時間インキュベーションした。プラーク形成を確認後、次に、ナイロンメンブレンへの転写を行った。転写は、ナイトラン (Nytran) 13N (シュライヒャーアンドシュウェル社製 (Schleicher and Schuell Co.)) を用いて行った。12.5 cm x 9.0 cmのフィルターを蒸留水に浸けて10分間湿らせた後、ワットマン3MM紙上において余分な水分を除去し、プラークを形成したプレート上にフィルターを置いた。2分間放置した後、フィルターを剥がし、10分間風乾させた。0.2 M NaOH/1.5 M NaClにより2分間ファージDNAを変性させ、~~0.4 M Tris-HCl (pH7.6) / 2 x SSC~~で2分間中和し、~~2 x SSC~~で2分間洗浄を行った。その後、GS GENE LINKER (バイオラッド社製) で紫外線照射することによりメンブレンに固定した。ハイブリダイゼーションおよびシグナルの検出は以下の様に行った。フィルターを2 x SSCで湿らせ、余分な水分をワットマン3MM紙で除去し、ハイブリダイゼーションバックに移しハイブリダイゼーション溶液 (5 x SSC、1%ブロッキング剤、0.1% N-ラウロイルサルコシン、0.02% SDS) と68℃にて1時間プレハイブリダイゼーションを行った。続いて、バックからハイブリダイゼーション溶液を除き、そこへDIGでラベルしたcDNAプローブを10 ng/mlになるように調製したハイブリダイゼーション溶液を加え、55℃にて16時間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション終了後、

フィルターは室温にて2 x SSC/0.1%SDS溶液で5分間、2回洗浄し、55℃にて、0.5 x SSC/0.1%SDS溶液で15分間2回洗浄した。次にDIG緩衝液 I (100 mM Tris-HCl、150 mM NaCl (pH7.5)) で1分間、SDSを除去し、DIG緩衝液II (1%ブロッキング剤、DIG緩衝液 I) で30分間、フィルターのブロッキングを行った。DIG緩衝液 I で1分間洗浄し、次いでDIG緩衝液IIで抗DIGアルカリフォスファターゼ標識抗体 (ペーリンガー・マンハイム社製) を5000倍希釈した溶液を加えて、30分間抗体反応を室温で行った後、室温でDIG緩衝液 I で15分間2回洗浄した。DIG緩衝液III (100 mM Tris-HCl、100 mM NaCl (pH 9.5)、50 mM MgCl<sub>2</sub>) で3分間処理することによりMg<sup>2+</sup>の濃度を高め、NBT/BCIP (和光純薬社製) をDIG緩衝液IIIに加えた溶液で発色させたところ、13個の陽性クローンが得られた。これらのクローンに相当するプラークをプレートから切り出し、SM緩衝液1 mlを入れたチューブに加え、10分間攪拌した後SM緩衝液で段階希釈し、この希釈液0.1 mlとmLB培地で37℃16時間培養したEscherichia coli Y1090r<sup>-</sup>0.2 mlを混ぜ、37℃にて15分間インキュベートした。その後、混合液を2.5 ml LB-TOPアガロースに加えて均一とし、90mmφLB培地プレートにまいたものを10枚作製し、15分間室温で固化させ、42℃にて5時間インキュベーションし、いくつかのプラークを得、一次スクリーニングと同様にして二次スクリーニングを行った。

【0025】

実施例4：新規ヒトコレクチンの塩基配列の決定

二次スクリーニングで得られた陽性クローンのうち適切と考えられる2クローン (HLI1-3M、HLI1-9) のプラークをプレートから切り出し、SM緩衝液 1 mlを入れたチューブに加えて攪拌した後、50 μlをmLB培地で37℃16時間培養したEscherichia coli Y1090r<sup>-</sup> 50 μlと共にmLB培地4.95mlに加え、37℃にて16時間培養した。クロロホルム1滴を加え、3分間攪拌した後、10,000 rpmで5分間遠心分離し、上清を得た。

【0026】

得られた上清を鋳型とし、TaKaRa LA PCR Kit Ver.2 (宝酒造社製) を用い、PCRによりインサートDNAを増幅させた。PCRの反応組成は以下のとおりである (上清 : 11 μl、10 x LA PCR 緩衝液 II (Mg<sup>2+</sup> 不含) : 2.5 μl、25 mM MgCl<sub>2</sub> :

5  $\mu$ l、dNTPミックス：8  $\mu$ l、20  $\mu$ M  $\lambda$ gt11 Reverseプライマー（配列番号：9、5'-TTGACACCAGACCAACTGGTAATG-3'）：2.5  $\mu$ l、20  $\mu$ M  $\lambda$ gt11 Forwardプライマー（配列番号：10、5'-GGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCG-3'）：1  $\mu$ l、LA Taq ポリメラーゼ：0.5  $\mu$ l、H<sub>2</sub>O：全容量50  $\mu$ lになるように添加）。PCR反応は、アプライドバイオシステムズ社製ジーンAmp PCRシステム9600を用いて、98℃10秒、68℃5分のサイクルを30回行った。PCR産物は、1%アガロースゲル電気泳動にて確認後、ゲルからの切り出しにより精製した。精製には、ファルマシア社製Se phaglas BandPrep Kitを用いた。

【0027】

切り出したDNA断片は、インビトロジェン社製TAクローニングキットのpCR2.1ベクターに組み込んだ。組換えたベクターは、インビトロジェン社製TAクローニングキットに含まれるTOP10F'細胞に形質転換した。形質転換体をLB培地（100  $\mu$ g/ml アンピシリン）で培養し、アルカリSDS法により各クローンにつき2種類（HLI1-3M-1、HLI1-3M-2、HLI1-9-1、HLI1-9-2）のプラスミドを抽出し、ファルマシア社製 オートリード・シーケンシング・キットおよび A.L.F.オートシーケンサーで塩基配列の決定を行った。プライマーはまずオートリード・シーケンシング・キット添付のM13 Universal Primer（配列番号：5）およびM13 Reverse Primer（配列番号：6）を用い、以後、明らかになった塩基配列をもとにFITC（ファルマシア社製 Fluore Prime）にてラベルした以下のプライマー（3MU0～9R3）をDNA/RNAシンセサイザーを用いて作製し、全領域の配列を決定した。

【0028】

3MU0：5'-フルオレセイン-TAATGGTAGCGACCGGCGCT-3'（配列番号：11）、  
 3MU1：5'-フルオレセイン-AAACCAATTTATACTCCTGG-3'（配列番号：12）、  
 3MU2：5'-フルオレセイン-AATATTGGCAAGACTGGGCC-3'（配列番号：13）、  
 3MR1：5'-フルオレセイン-GATGAGTGTGTTGGCAGCAT-3'（配列番号：14）、  
 3MR2：5'-フルオレセイン-GTATCTTCCACAATCACAGA-3'（配列番号：15）、  
 3MR3：5'-フルオレセイン-TTAATTCCTTTTCGGCCCCAT-3'（配列番号：16）、  
 3MR4：5'-フルオレセイン-GCAAAAGAAATAGTACCAGG-3'（配列番号：17）、  
 3MR5：5'-フルオレセイン-CATATCACCCAGTTCTCCTT-3'（配列番号：18）、



9U1 : 5'-フルオレセイン-AGCAGGGATTAGGGAAACTG-3' (配列番号 : 19)、  
 9U3 : 5'-フルオレセイン-CTGTGAGCGTCATTACAGTT-3' (配列番号 : 20)、  
 9U4 : 5'-フルオレセイン-GGTTGTCTATATGTCAAATG-3' (配列番号 : 21)、  
 9U5 : 5'-フルオレセイン-TATGGCCATGGCTATACTTG-3' (配列番号 : 22)、  
 7U3 : 5'-フルオレセイン-ATCGCTGACTATGTTGCCAA-3' (配列番号 : 23)、  
 9R1 : 5'-フルオレセイン-CAAGTATAGCCATGGCCATA-3' (配列番号 : 24)、  
 9R2 : 5'-フルオレセイン-AACTGTAATGACGCTCACAG-3' (配列番号 : 25)、  
 9R3 : 5'-フルオレセイン-CATTTGACATATGAACAACC-3' (配列番号 : 26)

その結果、得られたcDNAクローンは配列番号 : 1 に示される1295塩基を含み、831塩基のORF (転写解読枠) を有し、配列番号 : 2 に示される277のアミノ酸をコードしていた。

#### 【0029】

この塩基配列決定における概略は、図4に示す通りである。図4 (a) に得られたコレクチンのORFが示され、この中のG-X-Yはコラーゲン様領域を表すものである。また、図4 (b) に、上記各プライマー名、シーケンサーにより読み取られた塩基配列 (矢印により表される)、ならびにM13 Universal Primer (Uで表される) およびM13 Reverse Primer (Rで表される) を示す。

#### 【0030】

図5及び6には、従来報告されている3種のコレクチンタンパク質のアミノ酸配列と、本発明のコレクチンタンパク質のアミノ酸配列のアラインメントを示す。図2及び3と同様に、相同性を有するアミノ酸残基部分に囲みを付した。

#### 【0031】

さらに、この新規コレクチンタンパク質の配列の構造的特徴について調べたところ、図7の模式図の通り、既知のコレクチン同様、(a) システインを含むN末端領域、(b) コラーゲン様領域、(c) ネック領域及び(d) 糖認識領域により構成されていることが示された。

#### 【0032】

しかしながら、GenBankデータベースでDNA及びアミノ酸についての相同性の検索を行った結果によれば、得られたタンパク質の配列は、従来見出されているコ

レクチンとは異なる新規のコレクチンのものであることが明らかとなった。

【0033】

実施例 5：新規コレクチンのゲノミックサザン分析

実施例 4 において明らかにされた cDNA 配列を有する新規コレクチンの遺伝子が、シングルコピー遺伝子であるかまたはマルチコピー遺伝子であるかを明らかにするために、ゲノミックサザン分析を行った。

【0034】

胎盤より抽出したゲノム DNA の 4  $\mu$ g 相当量を、制限酵素の EcoRI、HindIII、Bam HI、XbaI または SacI で消化し、0.7% アガロースゲルにて、100 mA で 3 時間電気泳動した。泳動終了後、ナイロンメンブレン（ナイトラン 13N）に転写して、分析用のメンブレンを作製した。転写は、先ず、電気泳動後のゲルを 100 ml の 0.25 N HCl に 10 分間浸し、蒸留水で 3 回洗浄した後、100 ml の変性液（1.5 M NaCl、0.5 M NaOH）に 15 分間 2 回浸し、100 ml の中和液（0.5 M Tris-HCl、3 M NaCl（pH 6.8））に 30 分間浸すことによって脱プリン化、変性及び中和の処理を施し、次いでバキュームブロッティングシステム（東洋紡エンジニアリング社製、VB-30）を用いて転写した。この際、メンブレンは、2 x SSC に 5 分間、次に 20 x SSC に 5 分間浸漬して前処理したものを用い、パッドは、20 x SSC をしみこませておいたものを用いた。転写終了後、UV 照射により固定処理を施した。

【0035】

サザン分析のためのハイブリダイゼーション用プローブとしては、実施例 4 で得られた新規コレクチンの cDNA 配列の ORF に相当する部分を、前記の PCR DIG プローブ合成キットを用いて DIG ラベルした DNA プローブを用いた。ハイブリダイゼーションの前に、プローブは 10 分間煮沸し、5 分間ドライアイス／エタノールで急速凍結処理しておいた。

【0036】

先ず、転写後のメンブレンを 2 x SSC に 5 分間浸し、ExpressHyb Hybridization Solution（クローンテック社製）10 ml 中で 68℃ にて 30 分間プレハイブリダイゼーションを行った。次いで、前記凍結処理後のプローブを ExpressHyb Hybridization Solution で 10 ng/ml となるように希釈し、この溶液 2 ml を用いて、68℃

にて1時間ハイブリダイゼーションを行った。

【0037】

ハイブリダイゼーション後のメンブレンの洗浄は、2 x SSC、0.1% SDS溶液20 mlで室温にて5分間ずつ2回振盪し、続いて0.2 x SSC、0.1% SDS溶液20 mlで68℃にて15分間ずつ2回振盪しながら行った。SDSを除去するために、DIG緩衝液 I (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl (pH 7.5)) 50 mlで室温にて1分間2回洗浄し、次にDIG緩衝液 II' (1.5% ブロッキング剤、DIG緩衝液 I) 50 mlで室温にて1時間ブロッキングを行った。次いで、0.2% Tween20を含むDIG緩衝液 I で5000倍に希釈しておいた抗DIGアルカリホスファターゼ標識抗体10 mlで30分間処理し、0.2% Tween20を含むDIG緩衝液 I を50 ml用い室温にて20分間、振盪しながら洗浄を2回行った。10 mlのDIG緩衝液 IIIに室温にて3分間2回浸した後、メンブレンをハイブリバックに移し、DIG緩衝液 IIIで100倍に希釈しておいたCSPD (登録商標、ベーリンガー・マンハイム社製、化学発光基質) を全体にゆきわたるように延ばし、インスタントフィルム57 (ポラロイド社製) 上で感光させた。

【0038】

この結果、図8の各レーンに示されるように、各制限酵素で処理したゲノムDNAより、それぞれ1～2個のシグナルしか検出されないので、得られた新規コレクチン遺伝子がシングルコピー遺伝子であることが推測された。

【0039】

実施例6：新規コレクチンのヒトの種々の組織についてのノーザン分析

本発明の新規コレクチンのmRNAの種々の組織における発現を調べるため、ノーザンハイブリダイゼーションにより解析を行った。

【0040】

ハイブリダイゼーション用プローブとしては、得られた新規コレクチンのcDNA配列 (配列番号：1) のORFに相当する部分を、DIG RNAラベリングキット (SP6/T7、ベーリンガー・マンハイム社製) を用いてDIGラベルしたRNAプローブを用い、また、メンブレンは、Human Multiple Tissue Northern (MTN) Blot (クローンテック社製) を用いて実施した。このメンブレンは、ヒト (a) 心臓、(b) 脳、(c) 胎盤、(d) 肺、(e) 肝臓、(f) 骨格筋、(g) 腎臓、及び (h)

）脾臓から得られたポリA<sup>+</sup> RNAをそれぞれ2 $\mu$ gずつ、1.2%ホルムアルデヒド変性アガロースゲルで電気泳動した後、電荷が改変されたナイロンメンブレンに転写し、UV照射により固定処理を施したものである。

#### 【0041】

以上のプローブとメンブレンを用いて、下記の工程に従ってハイブリダイゼーションを行った。まず、2 x SSCにメンブレンを5分間浸し、10mlのハイブリダイゼーション溶液（5 x SSC、10 x デンハーツ溶液、10 mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH 6.5）、50%ホルムアミド、0.5%SDS、0.1 mg/mlサケ精子DNA）中で65℃にて3時間プレハイブリダイゼーションを行い、プローブ（10分間煮沸し、5分間ドライアイス-エタノールで急速凍結処理しておいたもの）を1 $\mu$ g/mlになるようにハイブリダイゼーション溶液で希釈して、この溶液2 mlを用いて65℃にて18時間ハイブリダイゼーションを行った。

#### 【0042】

ハイブリダイゼーション後のメンブレンの洗浄は、2 x SSC、0.1%SDS溶液20 mlで室温にて5分間2回振盪し、続いて0.1 x SSC、0.1%SDS溶液20 mlで、68℃にて15分間2回、振盪しながら行った。SDSを除去するために、50 mlのDIG緩衝液Iで室温にて1分間2回洗浄し、次に50 mlのDIG緩衝液II' で、室温にて1時間ブロッキングを行った。次いで、0.2%Tween20を含むDIG緩衝液Iで5000倍に希釈しておいた抗DIGアルカリホスファターゼ標識抗体を10 ml用いて30分間処理し、0.2%Tween20を含むDIG緩衝液Iを50 ml用い室温にて20分間、振盪しながら洗浄を2回行った。10 mlのDIG緩衝液IIIに室温にて3分間2回浸した後、メンブレンをハイブリバックに移し、DIG緩衝液IIIで100倍に希釈しておいたCSPDを全体にゆきわたるように延ばし、インスタントフィルム612（ポラロイド社製）上で感光させた。

#### 【0043】

この結果を図9に示すが、本発明のコレクチンの、1.2 kbp及び3.8 kbpのmRNAが、肝臓（レーンe）及び胎盤（レーンc）で発現されており、特に肝臓において多量に発現が認められ、胎盤では若干量発現していることが明らかとなった。

【0044】

実施例7：新規コレクチンの種々の動物についてのゲノミックサザン分析

本発明のコレクチンの遺伝子が、他の動物種において保存されているか否かを明らかにするために、ゲノミックサザン分析を実施した。

【0045】

ハイブリダイゼーション用プローブとしては、前記の新規コレクチンのcDNA配列のORFに相当する部分を、PCR DIGプローブ合成キット（ベーリンガー・マンハイム社製）を用いてDIGラベルしたDNAプローブを用い、メンブレンは、ZOO-BLOT（クローンテック社製）を用いて実施した。このメンブレンは、（a）ヒト（胎盤）、（b）サル（Rhesus）（腎臓）、（c）ラット（Sprague-Dawley）（腎臓）、（d）マウス（Balb/c）（腎臓）、（e）イヌ（腎臓）、（f）ウシ（腎臓）、（g）ウサギ（腎臓）及び（h）ニワトリ（肝臓）から得られたゲノムDNAをそれぞれ4 $\mu$ gずつ、制限酵素EcoRIで処理し、アガロースゲルで電気泳動した後、電荷が改変されたナイロンメンブレンに転写し、UV照射により固定処理を施したものである。

【0046】

以上のプローブとメンブレンを用いて、下記の工程に従ってハイブリダイゼーションを行った。まず、2 x SSCにメンブレンを5分間浸し、10mlのExpressHyb Hybridization Solution中で65℃にて30分間プレハイブリダイゼーションを行った。次いで、前記と同様に凍結処理されたプローブをExpressHyb Hybridization Solutionで10 ng/mlとなるように希釈し、この溶液2 mlを用いて、65℃にて1時間ハイブリダイゼーションを行った。

【0047】

ハイブリダイゼーション後のメンブレンの洗浄は、2 x SSC、0.1% SDS溶液20 mlで室温にて5分間2回振盪し、続いて0.2 x SSC、0.1% SDS溶液20 mlで68℃にて15分間ずつ2回振盪しながら行った。SDSを除去するために、DIG緩衝液Iで室温にて1分間2回洗浄し、次に50 mlのDIG緩衝液II'で、室温にて1時間ブロッキングを行った。次いで、0.2% Tween20を含むDIG緩衝液Iで5000倍に希釈しておいた抗DIGアルカリホスファターゼ標識抗体を10 ml用いて30分間処理し、0.2

Gly Pro Lys Gly Asp Asp Gly Glu Lys Gly Asp Pro Gly Glu Glu Gly	
50 55 60	
AAG CAT GGC AAA GTG GGA CGC ATG GGG CCG AAA GGA ATT AAA GGA GAA	239
Lys His Gly Lys Val Gly Arg Met Gly Pro Lys Gly Ile Lys Gly Glu	
65 70 75	
CTG GGT GAT ATG GGA GAT CGG GGC AAT ATT GGC AAG ACT GGG CCC ATT	287
Leu Gly Asp Met Gly Asp Arg Gly Asn Ile Gly Lys Thr Gly Pro Ile	
80 85 90	
GGG AAG AAG GGT GAC AAA GGG GAA AAA GGT TTG CTT GGA ATA CCT GGA	335
Gly Lys Lys Gly Asp Lys Gly Glu Lys Gly Leu Leu Gly Ile Pro Gly	
95 100 105 110	
GAA AAA GGC AAA GCA GGT ACT GTC TGT GAT TGT GGA AGA TAC CGG AAA	383
Glu Lys Gly Lys Ala Gly Thr Val Cys Asp Cys Gly Arg Tyr Arg Lys	
115 120 125	
TTT GTT GGA CAA CTG GAT ATT AGT ATT GCC CGG CTC AAG ACA TCT ATG	431
Phe Val Gly Gln Leu Asp Ile Ser Ile Ala Arg Leu Lys Thr Ser Met	
130 135 140	
AAG TTT GTC AAG AAT GTG ATA GCA GGG ATT AGG GAA ACT GAA GAG AAA	479
Lys Phe Val Lys Asn Val Ile Ala Gly Ile Arg Glu Thr Glu Glu Lys	
145 150 155	
TTC TAC TAC ATC GTG CAG GAA GAG AAG AAC TAC AGG GAA TCC CTA ACC	527
Phe Tyr Tyr Ile Val Gln Glu Glu Lys Asn Tyr Arg Glu Ser Leu Thr	
160 165 170	
CAC TGC AGG ATT CGG GGT GGA ATG CTA GCC ATG CCC AAG GAT GAA GCT	575
His Cys Arg Ile Arg Gly Gly Met Leu Ala Met Pro Lys Asp Glu Ala	
175 180 185 190	
GCC AAC ACA CTC ATC GCT GAC TAT GTT GCC AAG AGT GGC TTC TTT CGG	623
Ala Asn Thr Leu Ile Ala Asp Tyr Val Ala Lys Ser Gly Phe Phe Arg	
195 200 205	

GTG TTC ATT GGC GTG AAT GAC CTT GAA AGG GAG GGA CAG TAC ATG TTC	671
Val Phe Ile Gly Val Asn Asp Leu Glu Arg Glu Gly Gln Tyr Met Phe	
210 215 220	
ACA GAC AAC ACT CCA CTG CAG AAC TAT AGC AAC TGG AAT GAG GGG GAA	719
Thr Asp Asn Thr Pro Leu Gln Asn Tyr Ser Asn Trp Asn Glu Gly Glu	
225 230 235	
CCC AGC GAC CCC TAT GGT CAT GAG GAC TGT GTG GAG ATG CTG AGC TCT	767
Pro Ser Asp Pro Tyr Gly His Glu Asp Cys Val Glu Met Leu Ser Ser	
240 245 250	
GGC AGA TGG AAT GAC ACA GAG TGC CAT CTT ACC ATG TAC TTT GTC TGT	815
Gly Arg Trp Asn Asp Thr Glu Cys His Leu Thr Met Tyr Phe Val Cys	
255 260 265 270	
GAG TTC ATC AAG AAG AAA AAG TAACTTCCCT CATCCTACGT ATTTGCTATT	866
Glu Phe Ile Lys Lys Lys Lys	
275	
TTCCTGTGAC CGTCATTACA GTTATTGTTA TCCATCCTTT TTTTCTGAT TGTACTACAT	926
TTGATCTGAG TCAACATAGC TAGAAAATGC TAAACTGAGG TATGGAGCCT CCATCATCAT	986
GCTCTTTTGT GATGATTTTC ATATTTTCAC ACATGGTATG TTATTGACCC AATAACTCGC	1046
CAGGTTACAT GGGTCTTGAG AGAGAATTTT AATTACTAAT TGTGCACGAG ATAGTTGGTT	1106
GTCTATATGT CAAATGAGTT GTTCTCTTGG TATTTGCTCT ACCATCTCTC CCTAGAGCAC	1166
<del>TCTGTGTCTA TCCCAGTGGG TAATTTCCCA GTTTACTGGT GATGATTAGG AAGGTTGTG</del>	<del>1226</del>
ATGGTTAGGC TAACCTGCCC TGGCCCAAAG CCAGACATGT ACAAGGGCTT TCTGTGAGCA	1286
ATGATAAGAT CTTTGAATCC AAGATGCCCA GATGTTTTAC CAGTCACACC CTATGGCCAT	1346
GGCTATACTT GGAAGTTCTC CTTGTTGGCA CAGACATAGA AATGCTTTAA CCCCAAGCCT	1406
TTATATGGGG GACTTCTAGC TTTGTGTCTT GTTTCAGACC ATGTGGAATG ATAAATACTC	1466
TTTTTGTGCT TCTGATCTAT CGATTTCAT AACATATACC AAGTAGGTGC TTTGAACCCC	1526
TTTCTGTAGG CTCACACCTT AATCTCAGGC CCCTATATAG TCACACTTTG ATTTAAGAAA	1586
AACGGAGCC	1595

配列番号：2

配列の長さ : 277

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列

Met Asn Gly Phe Ala Ser Leu Leu Arg Arg Asn Gln Phe Ile Leu Leu

1 5 10 15

Val Leu Phe Leu Leu Gln Ile Gln Ser Leu Gly Leu Asp Ile Asp Ser

20 25 30

Arg Pro Thr Ala Glu Val Cys Ala Thr His Thr Ile Ser Pro Gly Pro

35 40 45

Lys Gly Asp Asp Gly Glu Lys Gly Asp Pro Gly Glu Glu Gly Lys His

50 55 60

Gly Lys Val Gly Arg Met Gly Pro Lys Gly Ile Lys Gly Glu Leu Gly

65 70 75 80

Asp Met Gly Asp Arg Gly Asn Ile Gly Lys Thr Gly Pro Ile Gly Lys

85 90 95

Lys Gly Asp Lys Gly Glu Lys Gly Leu Leu Gly Ile Pro Gly Glu Lys

100 105 110

~~Gly Lys Ala Gly Thr Val Cys Asp Cys Gly Arg Tyr Arg Lys Phe Val~~

115 120 125

Gly Gln Leu Asp Ile Ser Ile Ala Arg Leu Lys Thr Ser Met Lys Phe

130 135 140

Val Lys Asn Val Ile Ala Gly Ile Arg Glu Thr Glu Glu Lys Phe Tyr

145 150 155 160

Tyr Ile Val Gln Glu Glu Lys Asn Tyr Arg Glu Ser Leu Thr His Cys

165 170 175

Arg Ile Arg Gly Gly Met Leu Ala Met Pro Lys Asp Glu Ala Ala Asn

180 185 190



Thr Leu Ile Ala Asp Tyr Val Ala Lys Ser Gly Phe Phe Arg Val Phe

195

200

205

Ile Gly Val Asn Asp Leu Glu Arg Glu Gly Gln Tyr Met Phe Thr Asp

210

215

220

Asn Thr Pro Leu Gln Asn Tyr Ser Asn Trp Asn Glu Gly Glu Pro Ser

225

230

235

240

Asp Pro Tyr Gly His Glu Asp Cys Val Glu Met Leu Ser Ser Gly Arg

245

250

255

Trp Asn Asp Thr Glu Cys His Leu Thr Met Tyr Phe Val Cys Glu Phe

260

265

270

Ile Lys Lys Lys Lys

275

配列番号 : 3

配列の長さ : 27

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Glu Lys Cys Val Glu Met Tyr Thr Asp Gly Lys Trp Asn Asp Arg Asn

5

10

15

Cys Leu Gln Ser Arg Leu Ala Ile Cys Glu Phe

20

25

配列番号 : 4

配列の長さ : 14

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : DNA

起源 :

配列の特徴：

特徴を表す記号：

存在位置：

特徴を決定した方法：

配列

GAATTCGGCA CGAG

14

配列番号：5

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CGACGTTGTA AAACGACGGC CAGT

24

配列番号：6

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CAGGAAACA GCTATGAC

17

配列番号：7

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

TTTTGATGGA GGCTCCATAC C

21

配列番号 : 8

配列の長さ : 21

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

CTGCCAACAC ACTCATCGCT G

21

配列番号 : 9

配列の長さ : 24

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

TTGACACCAG ACCAACTGGT AATG

配列番号 : 10

配列の長さ : 24

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

GGTGGCGACG ACTCCTGGAG CCCG

配列番号 : 11

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

TAATGGTAGC GACCGGCGCT

20

配列番号：1 2

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

AAACCAATTT ATACTCCTGG

20

配列番号：1 3

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

AATATTGGCA AGACTGGGCC

20

配列番号：1 4

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GATGAGTGTG TTGGCAGCAT

20

配列番号：1 5

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GTATCTTCCA CAATCACAGA

20

配列番号：16

配列の長さ：

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

TTAATTCCTT TCGGCCCCAT

20

配列番号：17

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GCAAAAGAAA TAGTACCAGG

20

配列番号：18

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CATATCACCC AGTTCTCCTT

20

配列番号 : 19

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

AGCAGGGATT AGGGAAACTG

20

配列番号 : 20

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

CTGTGAGCGT CATTACAGTT

20

配列番号 : 21

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

GGTTGTCTAT ATGTCAAATG

20

配列番号 : 22

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

TATGGCCATG GCTATACTTG

20

配列番号：23

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ATCGCTGAC TATGTTGCCAA

20

配列番号：24

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CAAGTATAGC CATGGCCATA

20

配列番号：25

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

AACTGTAATG ACGCTCACAG

20

配列番号：26

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CATTGACAT ATGAACAACC

20

【図面の簡単な説明】

【図1】

従来報告されている主なコレクチンの基本構造及びタンパク質の概観を示す図である。

【図2】

従来報告されている3種のコレクチンのアミノ酸配列のアラインメントの前半部分を示す図である。

【図3】

図2と同様のアラインメントの後半部分を示す図である。

【図4】

本発明の新規コレクチンの塩基配列を決定するために使用した各プライマーの名称と、シーケンサーにより読み取られた塩基配列を示す図（b）及び得られたコレクチンのORFを示す図（a）である。

【図5】

従来報告されている3種のコレクチンと、本発明の新規コレクチンのアミノ酸配列のアラインメントの前半部分を示す図である。

【図6】

図5と同様のアラインメントの後半部分を示す図である。

【図7】

従来報告されている3種のコレクチンと、本発明の新規コレクチンの基本構造、すなわち、（a）システインを含むN末端領域、（b）コラーゲン様領域、（



c) ネック領域及び (d)  $\text{Ca}^{2+}$  要求性の糖認識領域の比較を示す模式図である。

【図 8】

本発明の新規コレクチンのゲノミックサザン分析の結果を示す写真である。

【図 9】

本発明の新規コレクチンの臓器分布を示す、ヒトの種々の組織、すなわち、(a) 心臓、(b) 脳、(c) 胎盤、(d) 肺、(e) 肝臓、(f) 骨格筋、(g) 腎臓及び (h) 脾臓に対するノーザン分析の結果を示す写真である。

【図 10】

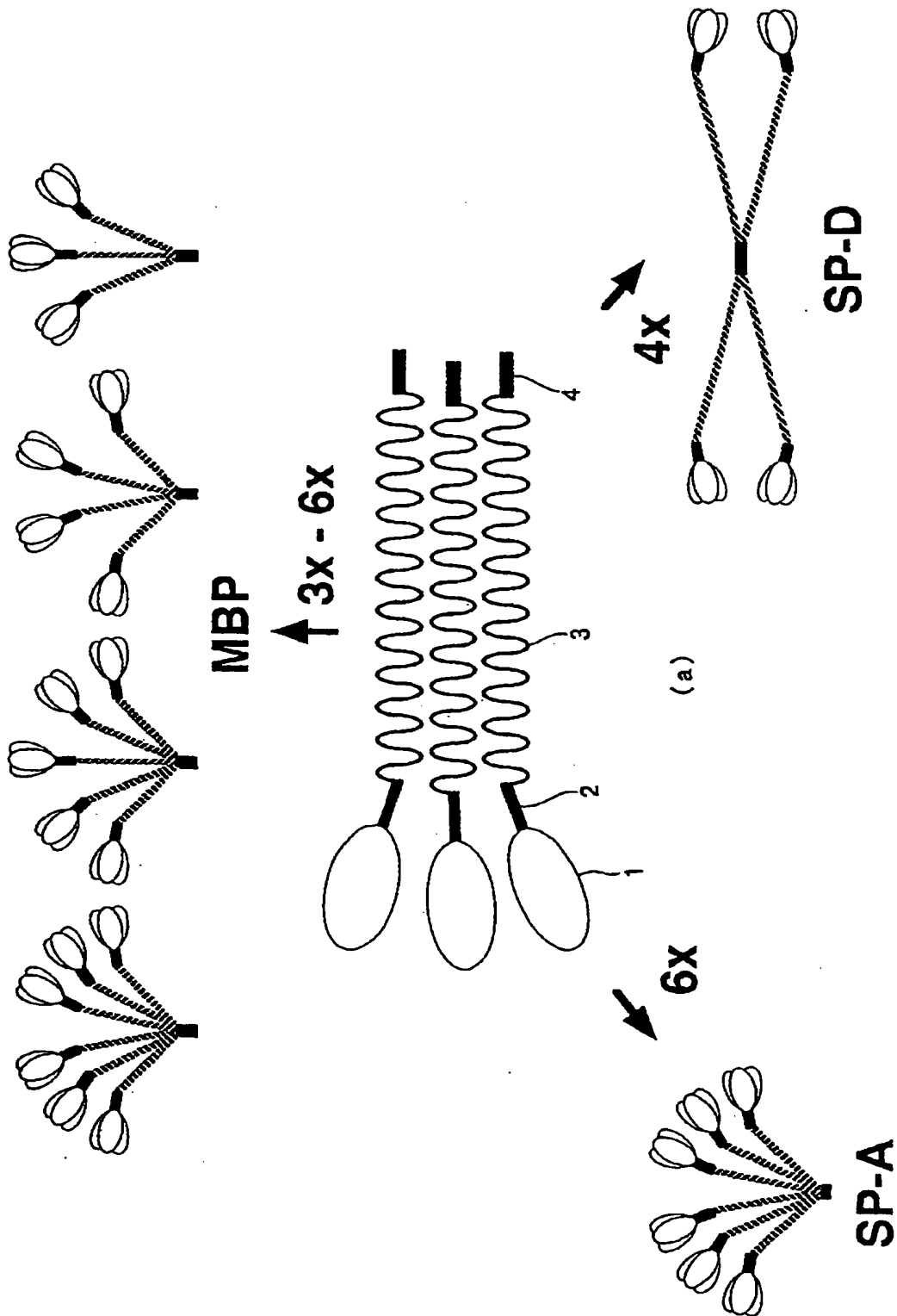
本発明の新規コレクチンの種間での保存性を示す、種々の脊椎動物、すなわち、(a) ヒト、(b) サル、(c) ラット、(d) マウス、(e) イヌ、(f) ウシ、(g) ウサギ及び (h) ニワトリにおけるゲノミックサザン分析の結果を示す写真である。

【図 11】

種々のコレクチンの遺伝的系統樹を示す図である。

【書類名】 図面

【図 1】

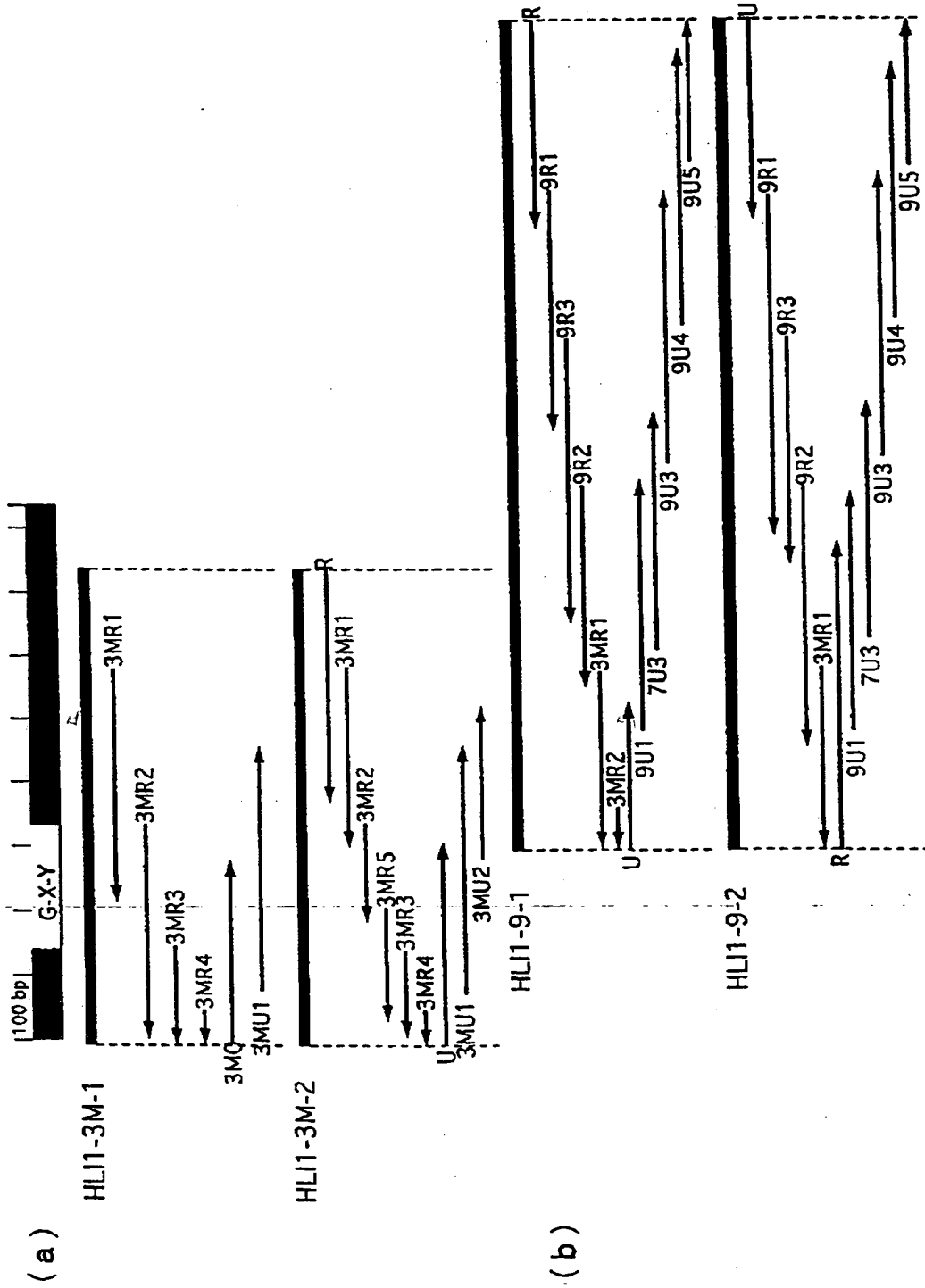


MSLFPS-LPLILLISMVAAYS[SETV]TCEDAQKI-----CPAVIACSS--PGINGFPCKDGRDGTKEKEGEPG  
 MMLCP[LALITLILMA-----ASGAACEVKDVGV-----GSPG  
 MLLFLI-SALVLLITQ-PLGVILEAMKTYSHRTTPSACTILV-MCSSVESGLPGRDGRDREGPRCEKEGDIPG  
 -----  
 IPGTPGSHGLPGRDGR-----DGVKGDIPGPPGPMGPPG-----ETP-----  
 LPGAAGQAGMPGQAGVPVGPCKDNGSVGEPPGPKGDTGPSPPGPPGVPGPAGREGPLGKQGNIGPQCKPGP 140  
 -----  
 QGLRGLQGP-----PKLGPFGNPGPSGSPGPKGOK  
 -----CPGNNGLPGAGVPGE-----RCEKGEPPGERGPPGL-----  
 KGEAGPKGEVGAPGMQGSACARGLAGPKGERGVPPGERGVPGNAGAAGSACAMGPQGSPPGARGPPLKGD 210

【図3】

MBP	GDPG-KSPDGDSSIAA-----SERKALQTEMARIKKWLTFSLCKQVGNKFFLTNGEIMTFEKV	280
SP-A	--PAHLDEELQATLHD----FRHQILQTRGALS-LQGS-----MTVGEKVFSSNGQSITFDAL	
SP-D	GIPGDKGAKGESCLPDVASLRQQVEALQGVQVHLQAAFSQYKKVELFPNGQSVGEKIFKTAGFVKFFTEA	280
	KALCVKFQASVATPRNAAENGAIQNLI---KEEAFGLITDEKTEGQFVDITGNRLTYTNWNEGEPNNAGS	
	QEACARAGRIAVPRNPEENEAIASFVKKYNTVAVVGLTEGSPGDFRYSDGTPVNTNWRGEPAGRG-	
	QLLCTQAGGQIASPRSAENAAIQQLVVAKNENAFLSMTDSKTEGKFTYPTGESLVYSNWAPGEPNDDGG	350
	DEDCVLLLNQGQWMDVPCTSTSELAVCEFP I *	
	KEQCVEMYIDGQWMDRNCCLYSRLTICEF*--	
	SEDCVEIFTNGKWMDRACGEXRLVVCEF*--	

【図4】



70

新規コレクション

```

EPC-----
SPGIPGTPGSHGLPGRDGR-----DGVKGDPPGPMGPPG-----ETP-----
DFGLPGAAGQAGMPQAGPVGPKGDNQSVGEPCPKGDTGPSGPPGVPGPAGREGLGKQGNIGPQGX
EKGDPDGEECKHQ-----KVGRMGPKGIKCELDGMDGRNIGKTGPICK-----

```

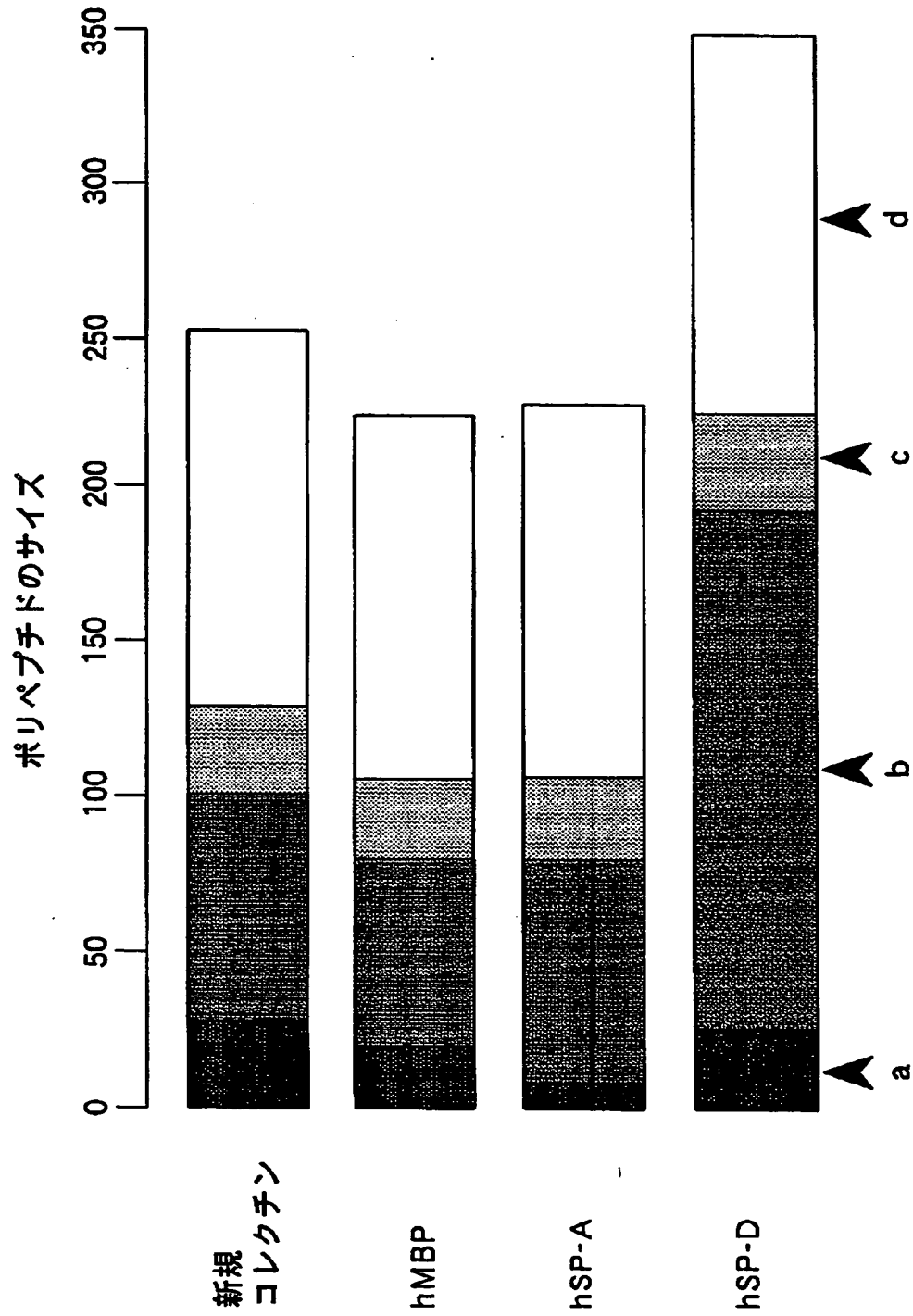
---QGLRGLQGP---PGKLGPPCNPGPSSPGPK  
 ---CPFGNGLPCAGVPGE---RCEKCEPGERGPPGL-  
 PGPKGEAGPKGEVGA<sup>210</sup>PGMQSA<sup>211</sup>GARGLAGPKCE<sup>212</sup>RGVPG<sup>213</sup>NGAG<sup>214</sup>AGSAG<sup>215</sup>MP<sup>216</sup>CGSP<sup>217</sup>GARG<sup>218</sup>PPGLK  
 ---KGDKEKGLLGI<sup>219</sup>PGEKKA<sup>220</sup>---

新規コレクション

EKVKALCVKFQASVATPRNAAENGAIQNLI---KEE-AFLGITDEKTEGQFVDLTICNRLI-YTNWNEGEP  
DAIQEACARAGGRIAVPRNPEENEAIASFVKKYNITY-AYVGLITEGSPGDFRYSDDGTPVN-YTNWYRGE  
TEAQILCTQAGGQLASPRSAANAALQQLVAKNEA-AFLSMTDSKTEGKFTIYPTGESLV-YSNWAPGEP  
RESLTHCRIRGGMLAMPKDEAANTLIADYVAKSGFRRVFIGVNDLIREGQYMFIDNTPLQNYSNWNEGEP

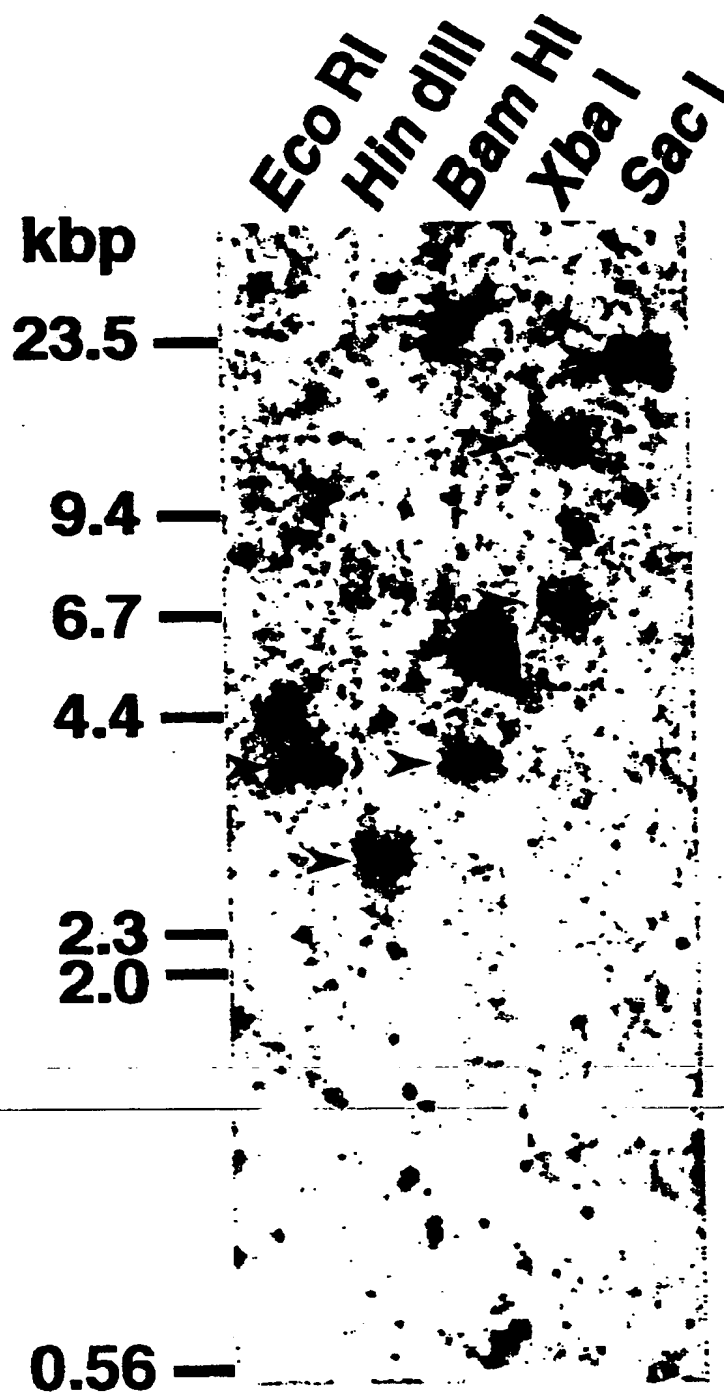
NNAGSDED CVLLKNGQWNDVPCSTSHLAVCEFP\*-----  
AGRG-KEQCVEMYDQWDRNCLYSRLTICEF\*-----  
NDDGGSDECVEIFTNGKWNDRACGEKRLVVCEF\*-----  
SDSPYGHEDCVEMLSGRWNDTECHLTMYFVCEFIKKKK\*

【図7】

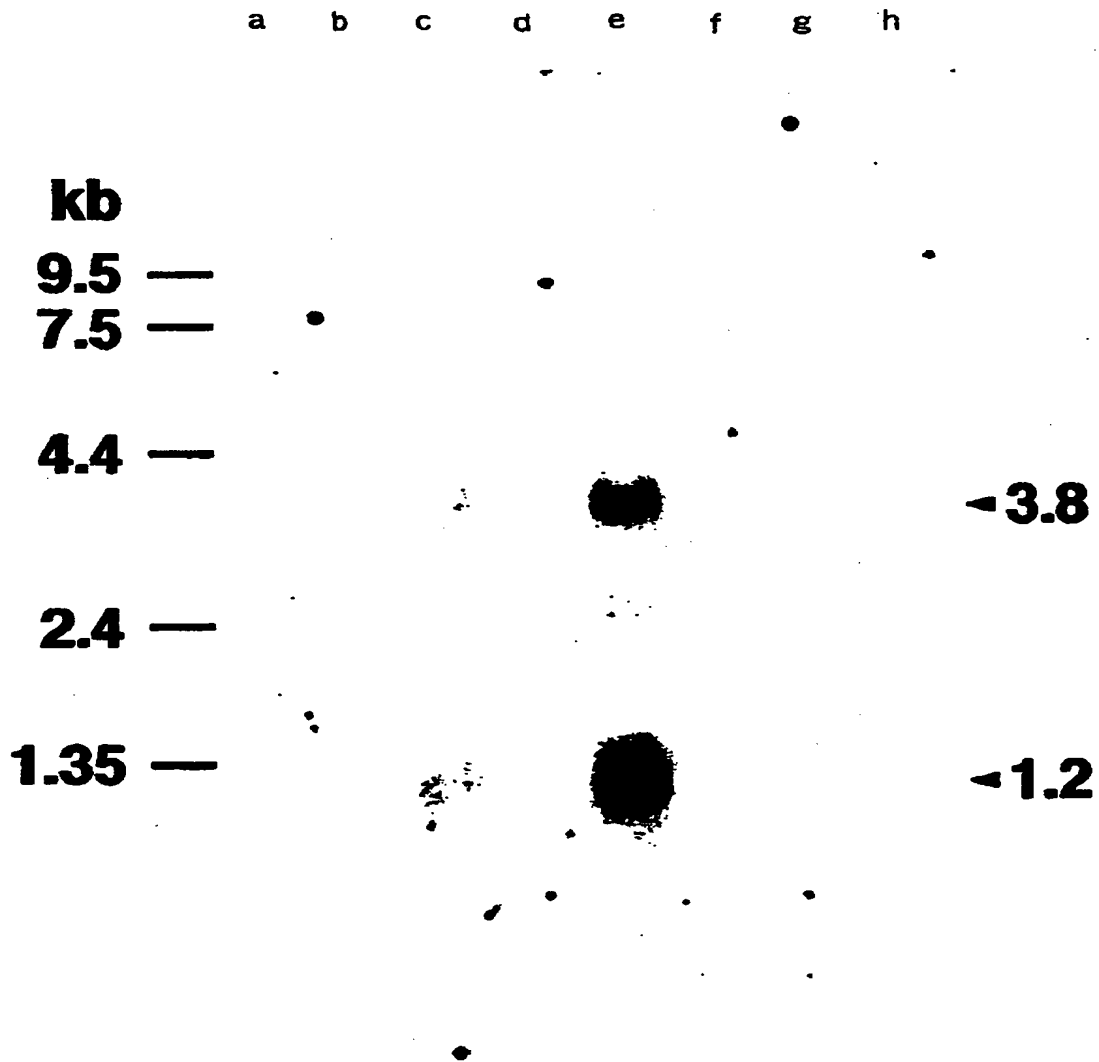




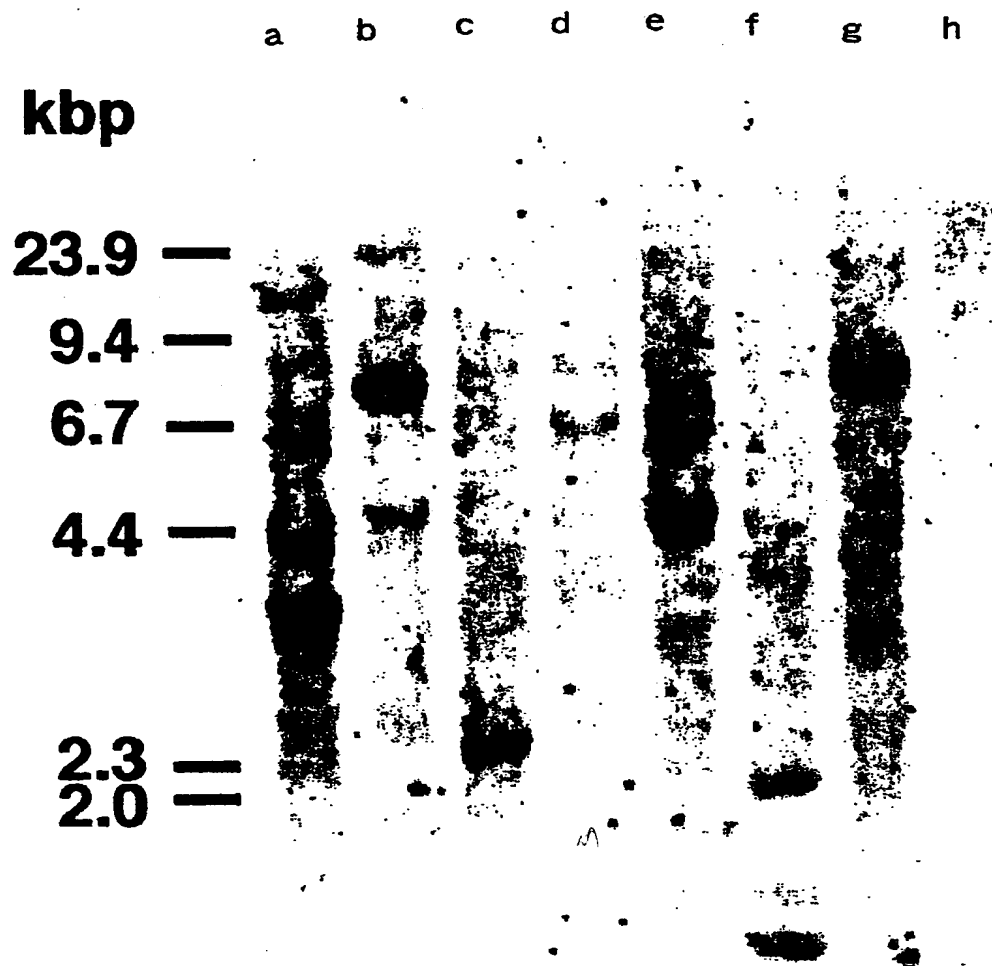
【图 8】



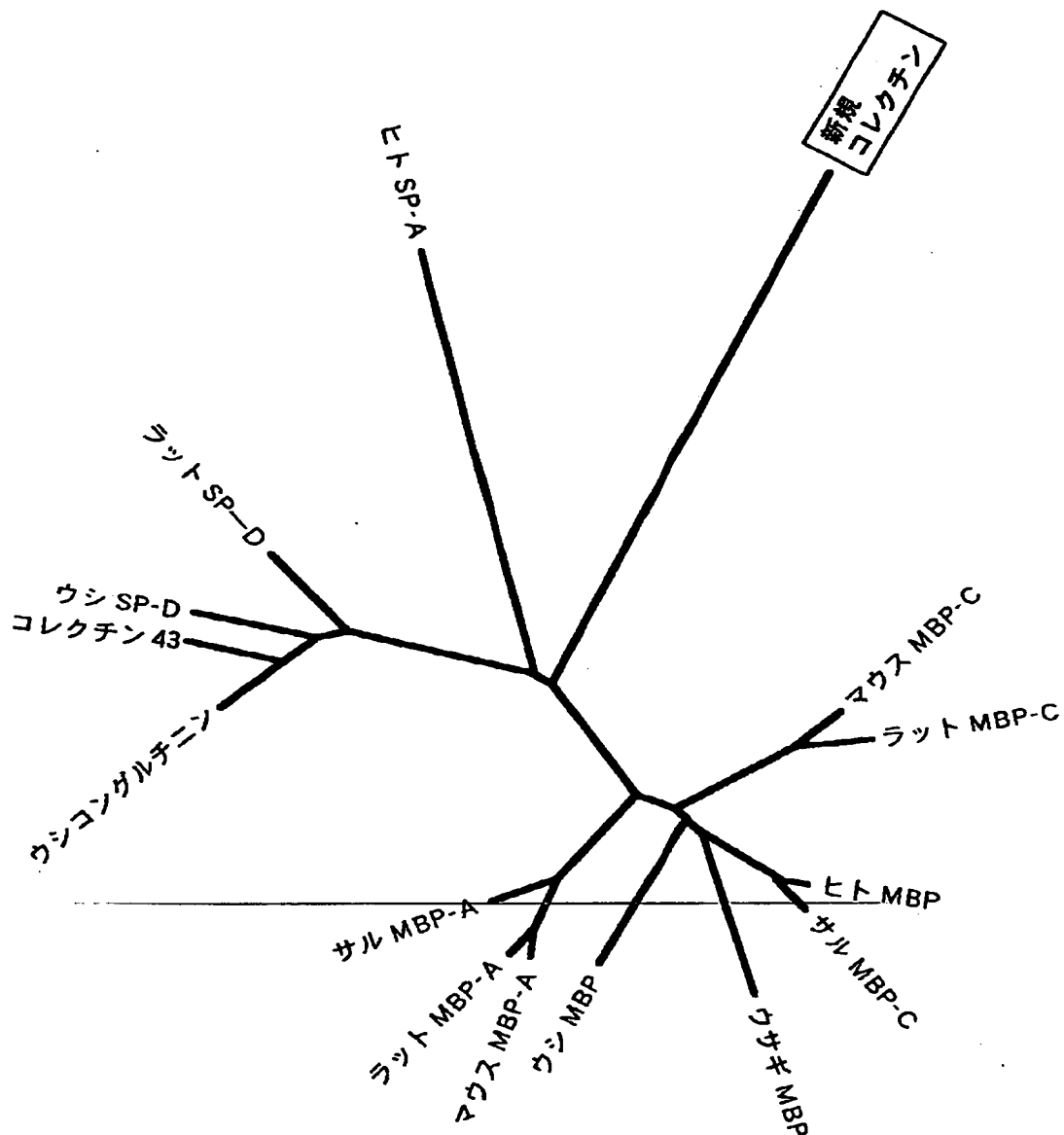
【図9】



【図10】



【図11】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 特にヒトの体内で抗細菌、ウイルス活性などを発揮することが期待される新規コレクチンを提供する。

【解決手段】 配列番号：1で示される塩基配列を含むコレクチン遺伝子及び配列番号：2で示されるアミノ酸配列を含むコレクチンタンパク質。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000238201

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号

【氏名又は名称】 扶桑薬品工業株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100065868

【住所又は居所】 兵庫県神戸市中央区東町123番地の1 貿易ビル  
3階 有古特許事務所

【氏名又は名称】 角田 嘉宏

【選任した代理人】

【識別番号】 100088960

【住所又は居所】 兵庫県神戸市中央区東町123番地の1 貿易ビル3  
階 有古特許事務所

【氏名又は名称】 高石 ▲さとる▼

【選任した代理人】

【識別番号】 100106242

【住所又は居所】 兵庫県神戸市中央区東町123番地の1 貿易ビル  
3階 有古特許事務所

【氏名又は名称】 古川 安航

【選任した代理人】

【識別番号】 100107940

【住所又は居所】 兵庫県神戸市中央区東町123番地の1 貿易ビル  
3階 有古特許事務所

【氏名又は名称】 岡 憲吾

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000238201]

1. 変更年月日 1990年 8月 8日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号  
氏 名 扶桑薬品工業株式会社

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**